

PRODUCTION OF HYDROLYZED PROTEIN

Publication number: JP7115969 (A)

Publication date: 1995-05-09

Inventor(s): FUJII MIKIO; NAGAOKA YOSHIKO

Applicant(s): ASAHI CHEMICAL IND

Classification:

- International: A23J3/06; A23J3/34; A23L1/227; C12N9/52; C12R1/38; C12R1/465; A23J3/00; A23L1/226; C12N9/52; A23L1/226; (IPC1-7) A23J3/06; A23L1/227; C12N9/52; A23J3/34; C12N9/52; C12R1/38; C12N9/52; C12R1/465

- European:

Application number: JP19930266467 19931025

Priority number(s): JP19930266467 19931025

Abstract of JP 7115969 (A)

PURPOSE: To obtain an enzymic agent, containing prolyl endopeptidase, prolidase and prolinase derived from the same microorganism and useful for providing a hydrolyzed protein useful as a quality improver, etc., for a seasoning or a food. **CONSTITUTION:** This enzymic agent contains prolyl endopeptidase, prolidase or prolinase derived from the same microorganism (e.g. a bacterium of the genus *Pseudomonas* or *Streptomyces*). Thereby, plural enzymes are stably present and peptide bond in which a hardly hydrolyzable proline residue participates is readily hydrolyzed to improve the hydrolytic ratio of proteins. The treatment with an enzyme having exopeptidase activities is combined therewith to further improve the hydrolytic ratio.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-115969

(43)公開日 平成7年(1995)5月9日

(51)Int.Cl. ⁴	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/52		9152-4B		
A 2 3 J 3/34				
// A 2 3 J 3/06				
A 2 3 L 1/227	B			
(C 1 2 N 9/52				

審査請求 未請求 請求項の数5 ○L (全7頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平5-266467	(71)出願人	000000033 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
(22)出願日	平成5年(1993)10月25日	(72)発明者	藤井 研夫 静岡県富士市駒島2番地の1 旭化成工業 株式会社内

(54)【発明の名称】 加水分解蛋白質の製造方法

(57)【要約】

【目的】 呈味力が増強され、味質の良い加水分解蛋白質を製造するための酵素剤ならびに製造法を提供する。

【構成】 同一微生物由来のプロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを含有することを特徴とする酵素剤および該酵素剤を用いた蛋白質の加水分解法。

【効果】 蛋白質が高度に加水分解され、呈味力が増強される。また、最終産物中のアスパラギン酸、スレオニン、グルタミン酸、プロリン、グリシン等呈味性の高いアミノ酸の遊離率が高まり、味質の良い加水分解蛋白質が製造できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 同一微生物由来のプロリエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを含有することを特徴とする酵素剤。

【請求項2】 微生物が *Pseudomonas* 属細菌である請求項1記載の酵素剤。

【請求項3】 微生物が *Streptomyces* 属細菌である請求項1記載の酵素剤。

【請求項4】 食品蛋白質、食品蛋白質の部分消化物、および食品蛋白質由来のペプチドを、請求項1乃至請求項3記載の酵素剤で消化することを特徴とする加水分解蛋白質の製造方法。

【請求項5】 エキソペプチダーゼ活性を有する酵素による消化を組み合わせることを特徴とする請求項4記載の加水分解蛋白質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、加水分解蛋白質の製造方法に関する。加水分解蛋白質は調味料、食品の品質改良剤等に幅広く利用されている。

【0002】

【従来の技術】 蛋白質の加水分解は従来核酸を添加して高温、高圧処理する事により行われている。特に食品用途では、製品に苦味を生じさせないために塩酸が用いられている。しかしながら、蛋白質を塩酸で加水分解した場合には蛋白質中に微量に残存している脂質類と塩酸とが反応する事によりモノクロロプロパンジオール(MCP)やジクロロプロパンオール(DCP)等の好ましくない塩素化化合物が生成することが近年問題になりつつある。一方、蛋白質分解酵素を用いた蛋白質の加水分解も多く報告されているが、高価な酵素を多量に必要とすること、反応中に菌糞汚染を生じる可能性が高いこと、さらに蛋白質を高度に加水分解することが困難であることから、実用化されている例は少ない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、複数の酵素が安定に存在しうる酵素剤を提供することにより、該酵素剤を用いて蛋白質を高度に加水分解する方法を開発することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 酵素による加水分解で蛋白質の加水分解率が低い原因としては、蛋白質中に存在するプロリン残基がポイントと考えられる。すなわち、プロリンは環状α-イミノ酸であり、他のアミノ酸とは異なる立体構造をしている。蛋白質またはペプチド中のプロリン残基のイミノ基やカルボキシル基が関与するペプチド結合は通常の蛋白質分解酵素による加水分解を受けにくいことが理由として考えられる。本発明者は上記の課題を解決すべく観察検討した結果、同一微生物由来のプロリエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよび

プロリナーゼを含有する酵素剤による処理、あるいは当該酵素剤処理とエキソペプチダーゼ活性を有する酵素による処理とを組み合わせることにより、従来加水分解され難かったプロリン残基が関与するペプチド結合が効率よく加水分解され、その結果、蛋白質の加水分解率を高めることができることを発見し、本発明を完成させるに至った。プロリエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼは、ほ乳類の臍器に広く分布しているが、臍器の入手が困難であるため、入手容易な微生物由来の酵素剤を用いることが望ましい。また、上記3種の酵素を別々の微生物から調製し、これらを混合することにより本発明と同様の操作を行うことも可能ではあるが、由来の異なる蛋白分解系酵素を混合した場合には、それぞれの酵素が互いに別の酵素蛋白質を加水分解する結果、酵素活性が急激に低下する恐れがある。これに対し、同一微生物由来の酵素の場合には、長期間の培養後でも安定に存在していたものであり、これらを同時に存在させても上記の様な活性低下の恐れはない。

【0005】 プロリエンドペプチダーゼ(別名ポストプロリクリーピング酵素またはプロリン特異的エンドペプチダーゼ、EC 3.4.21.26)を生産する微生物としては、*Flavobacterium* 属細菌、*Xanthomonas* 属細菌、*Alcaligenes* 属細菌、*Streptomyces* 属の放線菌が報告されている。通常のプロリエンドペプチダーゼは低分子ペプチドには作用するものの高分子ペプチドや蛋白質には作用しないが、*Streptomyces xanthophaeus* HA-36株が生産するプロリエンドペプチダーゼはカゼイン等の高分子基質を加水分解することが報告されている。これら微生物以外にもプロリエンドペプチダーゼを生産する微生物を新たにスクリーニングすることにより新規プロリエンドペプチダーゼを取得することも可能である。プロリエンドペプチダーゼを生産する微生物は、その培養液をカルボペニソキシーアラニルーアラニルーブロリルーパラニトロアニリド(以下Z-Ala-Ala-Pro-pNAと略す)に作用させ、黄色のパラニトロアニリンを遊離させることを指標に土壠等より分離することができる。

【0006】 プロリダーゼ(別名プロリンジペプチダーゼ、EC 3.4.13.9)を生産する微生物としては、*Escherichia coli*、*Lactococcus lactis*、*Streptococcus cremoris*、*Neurospora* 属糸状菌、*Thermus aquaticus*、*Pseudomonas* 属細菌等が報告されている。プロリダーゼはX-Proの構造のジペプチドを加水分解するが、X-Pro-Yの構造のトリペプチドのX-Pro結合を加水分解する場合もある。これら微生物以外にもプロリダーゼを生産する微生物を新たにスクリーニングするこ

とにより新規プロリダーゼを取得することも可能である。プロリダーゼを生産する微生物は、その培養液をグリシループロリン（以下Gly-Pheと略す）に作用させた後に生じる遊離プロリンを指標に土壤等より分離することができる。

【0007】プロリナーゼ（別名プロリルジペチダーゼ、EC 3.4.13.8）を生産する微生物としては、*Streptococcus cremoris*、*Streptococcus thermophilus*等が報告されている。プロリナーゼはPro-Xの構造のジペチドを加水分解する酵素であり、これら微生物以外にもプロリナーゼを生産する微生物を新たにスクリーニングすることにより新規プロリナーゼを取得することも可能である。プロリナーゼを生産する微生物は、その培養液をプロリルグリシン（以下Pro-Glyと略す）に作用させた後に生じる遊離プロリンを指標に土壤等より分離することができる。

【0008】プロリルエンドペチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを同時に生産する微生物として、*Pseudomonas* sp. KU-22株および*Streptomyces xanthophaeus* HA-36株があげられる。*Pseudomonas* sp. KU-22株は好気性の細菌であり、YM培地（ポリペプトン0.5%、酵母エキス0.3%、マルトエキス0.3%、グルコース1.0%、寒天1.0%、pH 7.2）上30°Cで培養した場合に淡黄土色、温潤で光沢のあるコロニーを形成する。細胞のサイズは0.4μm×1.6μmの直棒菌であり、グラム染色陰性、運動性あり、鞭毛有。ウレアーゼテスト陽性、カタラーゼテスト陽性、オキシダーゼテスト陽性、クエン酸利用テスト陽性、澱粉加水分解テスト陰性、グルコース酸化能（O-Fテスト）陽性。キノン系はQ-9、黄色色素產生なし、水溶性色素產生なし、紫光色素產生なし、アルギニン加水分解酵素テスト陰性。フォーグースプロスカウエルテスト（VPテスト）陰性、硝酸還元テスト陰性、メチルレッドテスト陰性、D-グルコース、D-マニトール、D-マンノース、エタノール、スクロースより好気条件下に酸を生成しない、37°C、40°C、42°Cで生育し、45°Cで生育しない、5%食塩存在下に生育し、10%食塩存在下に生育しない、好気条件下にD-グルコース、D-マニトール、D-マンノース、酢酸を資化し、スクロースを資化しない。尚、本菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-1378として寄託されている。

【0009】*Pseudomonas* sp. KU-22の培養液より酵素剤を得る方法は公知の方法をそのまま、または一部修正して用いることができる。これらペチダーゼの生産に適する培地としては、グルコース、脱脂大豆、食塩を含有する培地が有効である。培養温度30°Cで2日間程度の培養により著量のプロリルエンド

ペチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼが培地中に生産される。酵素の収量を増大させるために、超音波による菌体破碎または浸透圧ショック等を行うことにも有効である。菌体または菌体残渣を除去した後、たとえば硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、珠水クロマトグラフィー、ゲル滲透クロマトグラフィー等を行うことによりそれぞれの酵素が精製できるが、蛋白質の加水分解を行なう場合には培養液や菌体破碎液をそのまま、または粗精製程度で充分である。

【0010】*Streptomyces xanthophaeus* HA-36株はスター、無機塩寒天培地で30°Cで培養することにより、よく分岐した菌糸からstraight～flexurusの菌糸を伸長し、成熟した菌糸の先に10～50個の楕円～円筒形の胞子からなる胞子頭を形成する。胞子殻は無く、胞子の大きさは0.7～1.0×1.0～1.5μmで、胞子表面はsmoothであり、鞭毛は認められない。本菌株の細胞壁の糖成分には特に特徴は認められず、細胞壁成分のジアミノペプチドはL-L型である。尚、本菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13827として寄託されている。

【0011】*Streptomyces xanthophaeus* HA-36株の培養液より酵素剤を得る方法は、公知の方法をそのまま、または一部修正して用いることができる。ペチダーゼの生産に適する培地としては、グルコース、澱粉、乾燥酵母、食塩を含有する培地が有効である。培養温度30°Cで4日間程度培養することにより著量のプロリルエンドペチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼが培地中に生産される。菌体および不溶性成分を除去した後、たとえば硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、珠水クロマトグラフィー、ゲル滲透クロマトグラフィー等を行うことによりそれぞれの酵素が精製できるが、蛋白質の加水分解を行なう場合には培養液をそのまま、または粗精製程度で充分である。尚、既知のプロリルエンドペチダーゼは通常高分子の基質に対しては全く作用しないが、本微生物が生産するプロリルエンドペチダーゼは高分子基質であるカゼインに対しても加水分解活性を示すことが特徴である。

【0012】蛋白質を加水分解する場合には、まず対象となる蛋白質を通常の蛋白質加水分解酵素で低分子化しておくことが望ましい。用いる酵素としてはエンド型活性の高いものが適している。市販の酵素としてはノボ社のアルカラーゼやニュートラーゼ、天野製薬のプロテアーゼ等が利用できる。エンド型酵素による消化が終了した後に残存する酵素はプロリルエンドペチダーゼの安定性に悪影響を及ぼす場合があるため、限外濾過等による除去または加熱失活等を行なうことが望ましい。

【0013】あらかじめエンド型酵素で処理した蛋白質

をブロリルエンドペプチダーゼ、ブロリダーゼおよびブロリナーゼを含む酵素剤で処理する場合には、同一微生物の培養液や細胞破砕液をそのまま使用するか、またはこれらより酵素を粗精製したものを用いることができる。反応は通常の酵素反応と同じく酵素が失活しない程度の一定の温度で攪拌条件で行うことが望ましい。

【0014】加水分解の最終段階として、エキソ型活性の高い酵素による加水分解を行ってもよい。エキソ型酵素による加水分解に先立ち、ブロリルエンドペプチダーゼ、ブロリダーゼおよびブロリナーゼの除去または失活処理を行うことは必ずしも必要ではない。反応液のpHを適宜調整した後、エキソ型活性の高い酵素を添加して反応を行う。用いる酵素としては天野製薬のブロテアーゼM、プロテアーゼA、科研製薬のアクチナーゼ等の酵素が利用可能であるが、*Aspergillus fumigatus* R hizopodus属、*Streptomyces* 属等の培養液等を酵素剤の代わりに用いることも可能である。酵素反応が終了した後、脱色、濃縮、殺菌等の処理を行い、目的の加水分解蛋白質が調製される。

【0015】本発明により得られる加水分解蛋白質は、ブロリルエンドペプチダーゼ、ブロリダーゼおよびブロリナーゼを含む酵素剤による加水分解工程を行わない場合に比較してその加水分解率(アミノ酸の遊離率)が上昇しており、中でもグルタミン酸、グリシン、ブロリン等の呈味性の高いアミノ酸の遊離率が特に上昇するため、食品用途、特に調味料としての利用価値がより高まることが特徴である。

【0016】以下に本発明の実施例を示すが、本発明がこれらに限定されるものではない。

【0017】

【実施例】

【0018】

【実施例1】

1) KU-22粗酵素液の調製

Pseudomonas sp. KU-22株を2%グルコース、2%脱脂大豆、0.3%食塩よりなる培地100ml(pH7.2)を含む50ml容坂口フラスコ6本に移植し、30℃で4時間振盪培養を行った。培養液より遠心分離により(8,000×g、20分)菌体を集め、20mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)で2回洗浄後、菌体を超音波処理することにより粉砕した。その後遠心分離(8,000×g、20分)により細胞残渣を除去することにより無細胞抽出液23.3mlを得た。この無細胞抽出液を氷水中で冷却攪拌しながら90%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、30分間氷水中で攪拌させた後4℃で一夜放置した。沈澱物をセリヤド過濾により回収し、氷冷した2.0mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)(以下緩衝液Aと称する)に溶解し、遠心分離(8,000×g、20分)によりセライトを除去した。続いて緩衝液Aに対して透析を行

い、粗酵素液を得た(以下KU-22粗酵素液と称する)。

【0019】ブロリルエンドペプチダーゼ活性の測定は以下の条件にて行った。即ち、1mM Z-A1a-A1a-P ro-pNA(4.0%メタノールに溶解)200μlに50mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)800μlを加え、37℃で5分間予備保温した後、酵素サンプル(緩衝液Aで適宜希釈したもの)200μlを添加して30分間反応させた。1Mの酢酸ナトリウム緩衝液(pH3.5)を4000μl加えて反応を停止させた。基質に1M酢酸緩衝液(pH3.5)をあらかじめ加えた後で酵素サンプルを添加したものをブランクとして410nmの吸光を測定し、反応により遊離したパニトリアニリンの量を求めた。尚、ブロリルエンドペプチダーゼ1単位は1分間に1μmolのパニトリアニリン相当量を遊離させるに必要な酵素量と定義した。KU-22粗酵素液のブロリルエンドペプチダーゼの活性は0.14単位/mlであった。

【0020】ブロリダーゼ活性の測定は以下の条件で行った。即ち、5mM Gly-Proを含む緩衝液Aに酵素サンプル(緩衝液Aで適宜希釈したもの)10μlを加え、37℃で30分間反応させた。これに和光純薬製ニンヒドリン液(アミノ酸自動分析装置用)4.0μlを加え、70℃で20分間加熱した後、蒸留水で10倍に希釈した。同時に、Gly-Pro溶液にニンヒドリン液を添加し、引き続き酵素サンプルを添加してニンヒドリン反応させ、蒸留水で10倍に希釈したものをブランクとした。それぞれの350nmの吸光度を測定することにより、酵素反応により生じた350nmの吸光度の増加を求めた。一方、5mMのGly-Pro溶液と、5mMグリシンおよび5mMブロリンを含む溶液を適宜混合し、この混合液200μlに蒸留水10μlを加え、上記と同様にニンヒドリン反応と蒸留水による希釈を行ったものを各種準備し、これらの350nmの吸光度を測定して標準曲線を作成した。標準曲線により遊離ブロリンの濃度を求め、ブロリダーゼにより生じたブロリン量を算出した。尚、ブロリダーゼ1単位は1分間に1μmolのブロリンを遊離させるに必要な酵素量と定義した。KU-22粗酵素液のブロリダーゼ活性は0.64単位/mlであった。

【0021】ブロリナーゼ活性の測定は以下の条件で行った。即ち、5mM Pro-Glyを含む緩衝液Aに酵素サンプル(緩衝液Aで適宜希釈したもの)10μlを加え、37℃で30分間反応させた。これに和光純薬製ニンヒドリン液(アミノ酸自動分析装置用)4.0μlを加え、70℃で20分間加熱した後、蒸留水で10倍に希釈した。同時に、Pro-Gly溶液にニンヒドリン液を添加し、引き続き酵素サンプルを添加してニンヒドリン反応させ、蒸留水で10倍に希釈したものをブランクとした。それぞれの350nmの吸光度を測定する

ことにより、酵素反応により生じた350 nmの吸光度の増加を求めた。一方、5 mMのPro-Gly溶液と、5 mMグリシンおよび5 mMプロリンを含む溶液を適宜混合し、この混合液200 μlに蒸留水10 μlを加え、上記と同様にニンヒドリン反応と蒸留水による希釈を行ったものを各種準備し、これらの350 nmの吸光度を測定して標準曲線を作成した。標準曲線により遊離プロリンの濃度を求め、プロリダーゼにより生じたプロリン量を算出した。尚、プロリナーゼ1単位は1分間に1 μmolのプロリンを遊離させるのに必要な酵素量と定義した。KU-22粗酵素液のプロリナーゼ活性は1.3単位/m1であった。

2) HA-36粗酵素液の調製

Streptomyces xanthophaeus HA-36株を1%グルコース、1%可溶性澱粉、2%乾燥酵母、0.3%食塩よりなる培地1000 ml (pH 7.2) を含む500 ml 容坂口フラスコ20本に移植し、30°Cで4日間振蕩培養を行った。培養液を遠心分離(8,000×g、20分)により菌体を除き、この液を水中で冷却沈降しながら80%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、30分間氷中で攪拌させた後4°Cで一夜放置した。沈殿物を遠心分離(8,000×g、20分)により回収し、氷冷した緩衝液Aに溶解させた。続いて緩衝液Aに対して透析を行い、粗酵素液を得た(以下HA-36粗酵素液と称す)。プロリルエンドペプチダーゼ活性は0.073単位/m1、プロリダーゼ活性は0.039単位/m1、プロリナーゼ活性は0.070単位/m1であった。

3) 蛋白質の調製とアルカラーゼ処理

5リットル容高圧オートクレーブに豚骨3600 gと水720 gを仕込み、密封後に昇温を開始した。オートクレーブの内圧が0.5 kg/cm²に達したらオートク

*レーブ内のエア抜きを実施し、再度密封してオートクレーブの内圧が5 kg/cm²になるまで加熱し、1時間煮出しが行った。冷却後、オートクレーブ内の液を5リットル容分液ロートに移し、上層の油を除いて下層の豚骨抽出液2400 gを回収し、これをエバボレーターで濃縮してT-N 7.7%、F-N 0.39%の濃縮液450 gを得た。本濃縮液210 gに水を780 gを加えて希釈後、1.6%水酸化ナトリウム溶液を加えてpHを8.0に調整した。この溶液にアルカラーゼ0.6 L (ノボ社製)を4 g 添加し、55°Cで6時間反応させた。反応中のpHは1.6%水酸化ナトリウム溶液で常時8.0となるように調整した。反応終了液を分画分子量6000の限外濾過膜(旭化成社製SIP-1013)で過濾して酵素を除去した。本アルカラーゼ処理液はT-N=1.63%、F-N=0.204%であり、加水分解率は12.5%と算出された。

4) 粗酵素液およびプロテアーゼMによる加水分解3本の試験管A、B、Cに上記3)で得られたアルカラーゼ処理液をそれぞれ1.5 mlずつ分注した。試験管Aは上記1)で得られたKU-22粗酵素液1.5 mlを、試験管Bには上記2)で得られたHA-36粗酵素液1.5 mlを、また試験管Cには蒸留水1.5 mlを添加して37°Cで24時間反応させた。反応終了後、pHをそれぞれ5.0に調整し、天野製薬製プロテアーゼMをそれぞれ2.0 gずつ添加し、50°Cで24時間反応させた。反応終了液をそれぞれサンプルA、B、Cと称し、ケルダール窒素(T-N)およびホルモール窒素(F-N)の分析を行った。表1に結果を示した通り、サンプルAおよびBではコントロールであるサンプルCに比べて加水分解率が約10%高くなっていた。

5) プロリルエンドペプチダーゼによる蛋白質の加水分解

サンプル	T-N (%)	F-N (%)	分解率 (%)
A	1.50	0.463	30.9
B	1.48	0.436	29.5
C	1.51	0.343	22.7

[0023]

[実施例2]

1) KU-22粗酵素液の調製

Pseudomonas sp. KU-22株を2%グルコース、2%脱脂大豆、0.3%食塩よりなる培地500 ml (pH 7.2) を含む5リットル容フラスコ2本に移植し、30°Cで48時間振蕩培養を行った。培養

液より遠心分離により(8,000×g、20分)菌体を集め、50 mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)で3回洗浄後、50 mMトリス-塩酸+1 mM EDTA (pH 8.0)+0.5 Mスクロースの緩衝液中に懸濁した。30°Cで30分間保温した後菌体を集め(8,000×g、20分)、これに50 mMトリス-塩酸+1 mM EDTAの緩衝液を加えて懸濁し、3

0℃で30分間保温することにより浸透圧ショックを施した。遠心分離(10,000×g、20分)により菌体を除去し、上澄液を旭化成社製限外濾過モジュールA IP-0013で濾過することにより酵素を濃縮し、1 mMの塩化マンガンを含む緩衝液Aに対して透析を行った結果、プロリルエンドペプチダーゼ活性が0.38単位/m1、プロリダーゼ活性が1.7単位/m1、プロリナーゼ活性が3.2単位/m1の酵素液約40m1を得た。

2) 蛋白質の調製とアルカラーゼ処理

前記実施例3の3)と同様の方法を用いて豚骨からの蛋白質の調製とアルカラーゼ処理を行い、T-N=1.6%、F-N=0.14%のアルカラーゼ処理液を得た。

3) 粗酵素液およびプロテアーゼMによる加水分解

500m1容三角フラスコに上記2)で得られたアルカ*

プロリルエンドペプチダーゼによる蛋白質の加水分解

サンプル	T-N (%)	F-N (%)	分解率 (%)
D	1.49	0.56	40
E	1.41	0.49	28

【0025】サンプルDおよびEにつき、アミノ酸分析を行った。全アミノ酸を測定する場合にはサンプルを6Nの塩酸存在下、120℃で18時間加水分解した後、遊離アミノ酸を測定する場合にはそのまま、日本電子社製JLC-300アミノ酸分析装置にて分析した。その結果を表7に示したが、サンプルDはサンプルEに比べ

* ラーゼ処理液200m1と上記1)で得られた粗酵素液30m1を加え、マグネットスターラーで攪拌しながら37℃で24時間反応させた。反応終了後、塩酸を加えてpHを5.0に調製し、旭化成社製限外濾過モジュールA IP-0013で濾過することにより酵素を除去した。この液に天野製薬のプロテアーゼMを5g添加し、スターラーで攪拌しながら50℃で30時間反応させた(サンプルD)。一方、粗酵素液の代わりに蒸留水を添加する以外全く同様に処理したものをコントロールサンプル(サンプルE)とした。サンプルD、EにつきT-NとF-Nの測定を行った結果(表2)サンプルEの分解率が26%であったのに対しサンプルDでは40%と高くなっていた。

【0024】

【表2】

【0025】

【表3】

てアスパラギン酸、スレオニン、グルタミン酸、プロリン、グリシン等の呈味性アミノ酸の遊離率が大幅に高まっており、苦みを呈する疎水性アミノ酸の遊離率はあまり増加していないことが確認された。

【0026】

【表3】

遊離アミノ酸の変化

アミノ酸	サンプルD	サンプルE
A s p	1. 54	0. 70
S er	3. 03	1. 20
T hr	2. 15	1. 13
G lu	2. 56	1. 35
P ro	3. 07	1. 53
G ly	6. 11	2. 19
A la	6. 75	4. 46
C ys	0. 37	0. 33
V al	2. 88	1. 94
M et	0. 72	0. 83
I le	1. 60	1. 06
L eu	3. 27	2. 45
T yr	1. 83	0. 94
P he	1. 54	1. 00
H is	1. 09	1. 12
L ys	1. 66	1. 02
A rg	2. 20	1. 81

サンプル中の全アミノ酸のモル数の合計に対する各遊離アミノ酸のモル数の比(%)で表示。

【0027】

【発明の効果】蛋白質の加水分解にプロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを含む酵素剤による処理とエキソペプチダーゼによる処理とを組み

合わせることにより加水分解率が向上し、さらに呈味性に優れたアミノ酸の遊離率が向上することから、食品、特に調味料用途の蛋白質の加水分解に効果的に利用できる。

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁴

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:38)

(C 1 2 N 9/52)

C 1 2 R 1:465)

Machine translation JP7115969

DETAILED DESCRIPTION

(19)Publication countryJapan Patent Office (JP)
(12)Kind of official gazettePublication of patent applications (A)
(11)Publication No.JP,7-115969,A
(43)Date of PublicationMay 9, Heisei 7 (1995)
(54)Title of the InventionA manufacturing method of hydrolysis protein
(51)International Patent Classification (6th Edition)
C12N 9/52 9152-4B

A23J 3/34

// A23J 3/06

A23L 1/227 B

(C12N 9/52

C12R 1:38)

(C12N 9/52

C12R 1:465)

Request for ExaminationUnrequested

The number of claims 5

Mode of ApplicationOL

Number of Pages7

(21)Application numberJapanese Patent Application No. 5-266467

(22)Filing dateOctober 25, Heisei 5 (1993)

(71)Applicant

Identification Number000000033

NameAsahi Chemical Industry Co., Ltd.

Address1-2-6, Dojimahama, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka

(72)Inventor(s)

NameFujii Mikio

Address2-1, Samejima, Fuji-shi, Shizuoka-ken Inside of Asahi Chemical Industry Co., Ltd.

(72)Inventor(s)

NameNagaoka Yoshiko

Address2-1, Samejima, Fuji-shi, Shizuoka-ken Inside of Asahi Chemical Industry Co., Ltd.

(57) Abstract

Objects of the InventionTaste power is reinforced and the enzyme agent and manufacturing method for manufacturing the good hydrolysis protein of the quality of taste are provided.

Elements of the InventionA hydrolysis method of protein using an enzyme agent containing same prolyl proteinase from microorganism, prolidase, and a prolinase, and this enzyme agent.

EffectProtein is hydrolyzed highly and taste power is reinforced. The liberation rate of high amino acid of taste, such as aspartic acid in an end product, threonine, glutamic acid, proline, and a glycine, increases, and the good hydrolysis protein of the quality of taste can be manufactured.

Claim(s)

Claim 1An enzyme agent containing same prolyl proteinase from microorganism, prolidase, and a prolinase.

Claim 2The enzyme agent according to claim 1 whose microorganisms are Pseudomonas group bacteria.

Claim 3The enzyme agent according to claim 1 whose microorganisms are Streptomyces group bacteria.

Claim 4A manufacturing method of hydrolysis protein digesting a partial digestion thing of foodstuffs protein and foodstuffs protein, and peptide of foodstuffs protein origin with the enzyme agent according to claim 1 to 3.

Claim 5A manufacturing method of the hydrolysis protein according to claim 4 combining digestion by an enzyme which has exopeptidase activity.

Detailed Description of the Invention

0001

Industrial ApplicationThis invention relates to the manufacturing method of hydrolysis protein. Hydrolysis protein is broadly used for the conditioning agent of a seasoning and foodstuffs, etc.

0002

Description of the Prior ArtMineral acid is added conventionally and proteinic hydrolysis is performed on an elevated temperature and by carrying out high pressure treatment. Chloride is used in order not to make a product especially produce bitter taste on a food-grade way. However, when chloride hydrolyzes protein, and the oil and fat and chloride which remain in the minute amount react into protein, it is becoming a problem that the chlorination compound which neither a monochloro propanediol (MCP) nor dichloropropanol (DCP) has generates in recent years. There are few examples put in practical use on the other hand from it being difficult to need an expensive enzyme for a large quantity, that a possibility of producing saprophytic-bacteria contamination during a reaction is high, and to hydrolyze protein highly further although many hydrolysis of the protein using a proteolytic enzyme is also reported.

0003

Problem(s) to be Solved by the InventionThe technical problem of this invention is developing the method of hydrolyzing protein highly using this enzyme agent by providing the enzyme agent with which two or more enzymes may exist stably.

0004

Means for Solving the Problem As a cause that a proteinic hydrolysis rate is low, proline residue which exists in protein is considered to be the point by hydrolysis by an enzyme. That is, proline is annular alpha-amino acid and it is having a different spacial configuration from other amino acid. It is considered as a reason that the peptide bond in which an amino group and a carboxyl group of proline residue in protein or peptide participate cannot receive hydrolysis by the usual proteolytic enzyme easily. As a result of inquiring wholeheartedly that the above-mentioned technical problem should be solved, this invention persons The same prolyl proteinase from microorganism, By combining processing by an enzyme agent containing prolidase and a prolinase or the enzyme agent processing concerned, and processing by an enzyme which has exopeptidase activity, It discovers that a peptide bond in which proline residue which was hard to be hydrolyzed conventionally participates is hydrolyzed efficiently, and a proteinic hydrolysis rate can be raised as a result, and came to complete this invention. although prolyl proteinase, prolidase, and a prolinase are widely distributed over a mammalian organ -- since acquisition of an organ is difficult -- acquisition -- it is desirable to use an easy enzyme agent from microorganism. Although it is also possible to perform the same operation as this invention by preparing the three above-mentioned sorts of enzymes from a separate microorganism, and mixing these, When a proteolysis system enzyme in which the origins differ is mixed, as a result of each enzyme's hydrolyzing another enzyme protein of each other, there is a possibility that enzyme activity may fall rapidly. On the other hand, in the case of the same enzyme from microorganism, even if it exists stably and makes these exist simultaneously also after prolonged culture, there is no fear of the above activity falls.

0005 As a microorganism which produces prolyl proteinase (an alias mailbox proline cleaving enzyme or proline specific proteinase, EC 3.4.21.26), Flavobacterium group bacteria, Xanthomonas group bacteria, Alcaligenes group bacteria, and a ray fungus of a Streptomyces group are reported. Although the usual prolyl proteinase does not act on polymers peptide or protein of what acts on low molecule peptide, It is reported that prolyl proteinase which Streptomyces xanthophaeus HA-36 share produces hydrolyzes polymers substrates, such as casein. It is also possible to acquire new prolyl proteinase by newly screening a microorganism which produces prolyl proteinase besides these microorganisms. A microorganism which produces prolyl proteinase, It is separable into an index from soil etc. to make the culture medium act on carbobenzoxy alanyl alanyl *****-***** nitroanilide (it abbreviates to Z-Ala-Ala-Pro-pNA below), and to separate yellow PARANITORO aniline.

0006 As a microorganism which produces prolidase (alias proline dipeptidase, EC 3.4.13.9), Escherichia coli, Lactococcus lactis, Streptococcus cremoris, a Neurospora group filamentous bacterium, Thermus aquaticus, Pseudomonas group bacteria, etc. are reported. Although prolidase hydrolyzes dipeptide of structure of X-Pro, X-Pro combination of tripeptide of structure of X-Pro-Y may be hydrolyzed. It is also possible to acquire new prolidase by newly screening a microorganism which produces prolidase besides these microorganisms. The microorganism which produces prolidase can separate into an index from soil etc. isolation proline produced after making the culture medium act on glycyl proline (it abbreviates to Gly-Pro below).

0007 Streptococcus cremoris, Streptococcus thermophilus, etc. are reported as a microorganism which produces a prolinase (an alias prolyl dipeptidase, EC 3.4.13.8). A prolinase is an enzyme which hydrolyzes dipeptide of structure of Pro-X, and it is also possible to acquire a new prolinase by newly screening a microorganism which produces a prolinase besides these microorganisms. The microorganism which produces a prolinase can separate into an index from soil etc. isolation proline

produced after making the culture medium act on a prolyl glycine (it abbreviates to Pro-Gly below).

0008 *Pseudomonas* sp.KU-22 share and *Streptomyces xanthophaeus* HA-36 share are raised as a microorganism which produces prolyl proteinase, prolidase, and a prolinase simultaneously. *Pseudomonas* sp.KU-22 share is a *Bacillus* of *****, YM culture medium (poly peptone 0.5%, 0.3% of yeast extract, and malto extract 0.3%, and glucose 1.0%, 1.0% of agar, pH 7.2) -- when it cultivates at upper 30 **, light ocher and a colony which is humid and is glossy are formed. Size of a cell is a direct *Bacillus* (0.4 micrometer x 1.6 micrometers), and Gram's stain negativity, Motile ****, a polar flagellum, a urease test positivity, a catalase test positivity, An oxidase test positivity, a citrate utilization test positivity, amylolysis test negativity, A glucose oxidation ability (OF-test) positivity and a quinone system Q-9, yellow-coloring-matter production nothing, Water-soluble-coloring-matter production nothing, fluorochrome production nothing, arginine hydrolase test negativity, Voges-Proskauer test (VP test) negativity, nitrate reduction test negativity, Methyl red test negativity, D-glucose, D-mannitol, D-mannose, 37 ** which does not generate acid under an aerobic condition from ethanol and sucrose, it grows at 40 ** and 42 **, and does not grow at 45 ** -- it grows under 5% salt existence, and does not grow under 10% salt existence -- utilization of D-glucose, D-mannitol, D-mannose, and the acetic acid is carried out under an aerobic condition, and utilization of the sucrose is not carried out. A bacteria stock is deposited with National Institute of Bioscience and Human-Technology as FERM P-13788.

0009 The method of obtaining an enzyme agent from culture medium of *Pseudomonas* sp.KU-22 can amend a publicly known method as it is or in part, and can use it. As a culture medium suitable for production of these peptidase, a culture medium containing glucose, a defatted soybean, and salt is effective. Remarkable prolyl proteinase, prolidase, and a prolinase are produced in a culture medium by culture for about two days with culture temperature of 30 **. In order to increase a yield of an enzyme, it is also effective to perform biomass crushing or an osmotic shock by an ultrasonic wave, etc. After removing a biomass or biomass residue, can refine each enzyme by performing ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography, canal chromatography, gel filtration chromatography, etc., but. When hydrolyzing protein, remaining as it is or rough refining grades are enough in culture medium or biomass crushing liquid.

0010 By cultivating at 30 ** by starch and a mineral salt agar medium, *Streptomyces xanthophaeus* HA-36 share, A spore chain which elongates aerial mycelium of straight-flexurus from a basis fungal thread which often branched, and becomes the point of aerial mycelium which matured from a spore of an ellipse of 10-50 pieces - a cylindrical shape is formed. There is no sporangium, a size of a spore is 0.7 to 1.0x1.0-1.5 micrometers, the spore surface is smooth, and a flagellum is not accepted. The feature in particular is not observed in a sugar component of a cell wall of a bacteria stock, but diaminopimelic acid of a cell wall component is LL type. A bacteria stock is deposited with National Institute of Bioscience and Human-Technology as FERM P-13827.

0011 The method of obtaining an enzyme agent from *Streptomyces xanthophaeus* HA-36 share culture medium can amend a publicly known method as it is or in part, and it can be used for it. As a culture medium suitable for production of peptidase, a culture medium containing glucose, starch, dried yeast, and salt is effective. Remarkable prolyl and PEPUCHIDASE, prolidase, and prolinase are produced in a culture medium by carrying out four-day grade culture with culture temperature of 30 **. After removing a biomass and an insoluble component, can refine each enzyme by performing ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography, canal chromatography, gel filtration chromatography, etc., but.

When hydrolyzing protein, remaining as it is or rough refining grades are enough in culture medium. Although known prolyl proteinase does not usually act at all to a substrate of polymers, it is the feature that prolyl proteinase which this microorganism produces shows hydrolyzing activity also to casein which is a polymers substrate.

0012 When it hydrolyzes protein, it is desirable to carry out depolymerize of the target protein by the usual proteolytic enzyme first. As an enzyme to be used, a high thing of mold activity is suitable. As a commercial enzyme, alcalase of Novo, the protease N of newt RAZE and Amano Pharmaceuticals, etc. can be used. And since an enzyme which remains after digestion by a mold enzyme is completed may have an adverse effect on the stability of prolyl proteinase, it is desirable to perform removal or heating inactivation by an ultrafiltration etc., etc.

0013 When processing protein beforehand processed with an end type enzyme with an enzyme agent containing prolyl proteinase, prolidase, and a prolinase, what rough-refined an enzyme from these using a culture and cell crushing liquid of the same microorganism as it is can be used. As for a reaction, it is desirable to carry out on churning conditions with a fixed temperature which is a grade in which an enzyme is not deactivated as well as the usual enzyme reaction.

0014 As a culmination of hydrolysis, hydrolysis by a high enzyme of exomold activity may be performed. It is not necessarily required to perform removal of prolyl proteinase, prolidase, and a prolinase or inactivation processing in advance of hydrolysis by an exomold enzyme. After adjusting the pH of reaction mixture suitably, it reacts by adding a high enzyme of exomold activity. Although enzymes, such as AKUCHINAZE of the protease M of Amano Pharmaceuticals, protease A, and Kaken Pharmaceutical, are available as an enzyme to be used, it is also possible to use culture medium, such as an Aspergillus group, a Rhizopus group, and a Streptomyces group, etc. instead of an enzyme agent. After an enzyme reaction is completed, decolorization, concentration, sterilization, etc. are processed and the target hydrolysis protein is prepared.

0015 Hydrolysis protein obtained by this invention Prolyl proteinase, As compared with a case where a hydrolysis process by an enzyme agent containing prolidase and a prolinase is not performed, the hydrolysis rate (liberation rate of amino acid) is rising. Since especially a liberation rate of high amino acid of taste, such as glutamic acid, a glycine, and proline, goes up especially, it is the feature that utility value as a food-grade way, especially a seasoning increases more.

0016 Although an example of this invention is shown below, this invention is not limited to these.

0017

Example

0018

Example 1

1) It transplanted to six 500-ml Sakaguchi flasks containing 100 ml (pH 7.2) of culture media which consist the preparation *Pseudomonas* sp.KU-22 share of KU-22 crude-enzyme liquid of glucose, a 2% defatted soybean, and 0.3% salt 2%, and shaking culture was performed at 30 ** for 48 hours. Biomasses (8, 000xg, 20 minutes) are collected by centrifugal separation from culture medium, and it is 20mM. It ground by ultrasonication a biomass after 2 times washing with tris-chloride buffer solution (pH 8.0). 233 ml of cell-free extracts were obtained by removing cell residue by centrifugal separation (8, 000xg, 20 minutes) after that. Carrying out cooling churning of this cell-free extract in ice, ammonium sulfate was added so that it might become saturation 90%, and it was neglected overnight at back 4 ** made to agitate in ice for 30 minutes. Cerite filtration recovered settlings, it dissolved in ice-cooled 20mM tris-chloride buffer solution (pH 8.0) (the buffer

solution A is called below), and centrifugal separation (8,000xg, 20 minutes) removed cerite. Then, it dialyzed to the buffer solution A and crude enzyme liquid was obtained (KU-22 crude-enzyme liquid is called below).

0019 Measurement of prolyl proteinase activity was performed on condition of the following. That is, they are 50mM to 1 mM Z-Ala-Ala-Pro-pNA(it dissolves in methanol 40%) 200microl. 800micro of tris-chloride buffer solution (pH 8.0) 1 is added, After carrying out preliminary incubation for 5 minutes at 37 **, enzyme sample (what was suitably diluted with buffer solution A) 200microl was added, and it was made to react for 30 minutes. The sodium acetate buffer solution (pH 3.5) of 1M was 400microl Added, and the reaction was stopped. After adding beforehand 1M acetic acid buffer solution (pH 3.5) to a substrate, 410-nm extinction was measured having used as blank what added the enzyme sample, and the quantity of the Para Nitori aniline separated by a reaction was calculated. One unit of prolyl proteinase was defined as the amount of enzymes required to separate the Para Nitori aniline considerable amount of 1micromol in 1 minute. The activity of the prolyl proteinase of KU-22 crude-enzyme liquid was 0.14 unit/ml.

0020 Measurement of prolidase activity was performed on condition of the following. That is, enzyme sample (what was suitably diluted with buffer solution A) 10microl was added to the buffer solution A containing 5 mM Gly-Pro, and it was made to react for 30 minutes at 37 **. After adding 40micro of the Wako Pure Chem ninhydrin liquid (for amino acid automatic analyzers) I to this and heating for 20 minutes at 70 **, it diluted with distilled water 10 times. Simultaneously, ninhydrin liquid was added in the Gly-Pro solution, the ninhydrin reaction of the enzyme sample was added and carried out successingly, and what was diluted with distilled water 10 times was made blank. By measuring each absorbance of 350 nm, the increase with an absorbance of 350 nm produced by the enzyme reaction was searched for. On the other hand, the Gly-Pro solution of 5mM and the solution containing 5mM glycine and 5mM proline are mixed suitably, Distilled water 10mul was added to 200micro of this mixed liquor I, what performed dilution by a ninhydrin reaction and distilled water like the above was prepared **various**, these absorbances of 350 nm were measured, and the standard curve was created. It asked for the concentration of isolation proline from the standard curve, and the amount of prolines produced by prolidase was computed. One unit of prolidase defined it as the amount of enzymes required to separate the proline of 1micromol in 1 minute. The prolidase activity of KU-22 crude-enzyme liquid was 0.64 unit/ml.

0021 Measurement of prolinase activity was performed on condition of the following. That is, enzyme sample (what was suitably diluted with buffer solution A) 10microl was added to the buffer solution A containing 5 mM Pro-Gly, and it was made to react for 30 minutes at 37 **. After adding 40micro of the Wako Pure Chem ninhydrin liquid (for amino acid automatic analyzers) I to this and heating for 20 minutes at 70 **, it diluted with distilled water 10 times. Simultaneously, ninhydrin liquid was added in the Pro-Gly solution, the ninhydrin reaction of the enzyme sample was added and carried out successingly, and what was diluted with distilled water 10 times was made blank. By measuring each absorbance of 350 nm, the increase with an absorbance of 350 nm produced by the enzyme reaction was searched for. On the other hand, the Pro-Gly solution of 5mM and the solution containing 5mM glycine and 5mM proline are mixed suitably, Distilled water 10mul was added to 200micro of this mixed liquor I, what performed dilution by a ninhydrin reaction and distilled water like the above was prepared **various**, these absorbances of 350 nm were measured, and the standard curve was created. It asked for the concentration of isolation proline from the standard curve, and the amount of prolines produced by prolinase was computed. One unit of prolinases defined it as the amount of enzymes required to separate the proline of 1micromol in 1 minute.

The prolinase activity of KU-22 crude-enzyme liquid was 1.3 units/ml. The preparation Streptomyces xanthophaeus HA-36 share of HA-36 crude-enzyme liquid 2) 1% glucose, It transplanted to 20 500-ml Sakaguchi flasks containing 100 ml (pH 7.2) of culture media which consist of soluble starch, 2% dried yeast, and 0.3% salt 1%, and shaking culture was performed for four days at 30 **. Carrying out cooling churning of this liquid in ice except for a biomass by centrifuging culture medium (8, 000xg, 20 minutes), ammonium sulfate was added so that it might become saturation 80%, and it was neglected overnight at back 4 ** made to agitate in ice for 30 minutes. Centrifugal separation (8, 000xg, 20 minutes) recovered settling, and it was made to dissolve in the ice-cooled buffer solution A. Then, it dialyzed to the buffer solution A and crude enzyme liquid was obtained (HA-36 crude-enzyme liquid is called below). As for prolyl proteinase activity, 0.039 unit **ml** /and the prolinase activity of 0.073 unit **ml** /and prolidase activity were 0.070 unit/ml.

3) The boiled pork ribs 3600g and the water 720g were taught to preparation of protein and alcalase processing 5 liter-capacity high voltage autoclave, and temperature up was started after seal. It heated until it carried out degassing in autoclave, it sealed again and the internal pressure of autoclave became 5 kg/cm², when the internal pressure of autoclave reached 0.5kg/cm², and ***** was performed for 1 hour. The liquid after cooling and in autoclave was moved to 5 liter-capacity separating funnel, 2400 g of lower layer boiled-pork-ribs extracts were collected except for the upper oil, this was condensed by the evaporator, and T-N7.7% and F-N0.39% of concentrate 450g was obtained. 780 g was added for water to this concentrate 210g, after dilution, the sodium hydroxide solution was added 16% and pH was prepared to 8.0. 4g of alcalase 0.6L (made by Novo) was added in this solution, and it was made to react to it at 55 ** for 6 hours. pH under reaction was adjusted so that it might always be set to 8.0 with a sodium hydroxide solution 16%. Post-reaction solution was filtered by the ultrafiltration membrane (SIP-1013 by Asahi Chemical Co., Ltd.) of the cut off molecular weight 6000, and the enzyme was removed. These alcalase treating solutions are T-N=1.63% and F-N=0.204%, and the hydrolysis rate was computed with 12.5%.

4) It poured distributively at a time 15 ml of alcalase treating solutions obtained by crude enzyme liquid and the test tube A, B, and C of the three hydrolysis by the protease M by the above 3, respectively. 1.5 ml of distilled water was added in the test tube C again, and 1.5 ml of HA-36 crude-enzyme liquid obtained by the test tube B by the above 2 in 1.5 ml of KU-22 crude-enzyme liquid obtained by the test tube A by the above 1 was made to react at 37 ** for 24 hours. pH was adjusted to 5.0 after ending reaction, respectively, and it added 0.2g of protease M made from Amano Pharmaceuticals at a time, respectively, and was made to react at 50 ** for 24 hours. Post-reaction solution was called the sample A, B, and C, respectively, and analysis of Kjeldahl nitrogen (T-N) and formol nitrogen (F-N) was conducted. With the samples A and B, the hydrolysis rate was high about 10% compared with the sample C which is control as the result was shown in Table 1.

0022

Table 1

0023**Example 2**

1) It transplanted to two 5 liter-capacity flasks containing 500 ml (pH 7.2) of culture media which consist the preparation *Pseudomonas* sp.KU-22 share of KU-22 crude-enzyme liquid of glucose, a 2% defatted soybean, and 0.3% salt 2%, and shaking culture was performed at 30 ** for 48 hours. Biomasses (8, 000xg, 20 minutes) are collected by centrifugal separation from culture medium, and they are after 3 times washing and 50mM with 50mM tris-chloride buffer solution (pH 8.0). Tris-chloride+1mM EDTA(pH 8.0)+0.5M It was suspended in the buffer solution of sucrose. After keeping it warm for 30 minutes at 30 **, biomasses are collected (8, 000xg, 20 minutes), and they are 50mM to this. The buffer solution of tris-chloride+1mM EDTA was added, it was suspended, and the osmotic shock was given by keeping it warm for 30 minutes at 30 **. Centrifugal separation (10, 000xg, 20 minutes) removes a biomass, and an enzyme is condensed by filtering supernatant liquor by Asahi Chemical Co., Ltd. make ultrafiltration module AIP-0013, As a result of dialyzing to the buffer solution A containing the manganese chloride of 1mM, prolyl proteinase activity obtained about 40 ml of enzyme liquid 1.7 units ml /and whose prolidase activity 0.38 unit ml /and prolidase activity are 3.2 units/ml.

2) Preparation of the protein from boiled pork ribs and alcalase processing were performed using the same method as preparation of protein and 3 of the alcalase processing aforementioned example 3, and T-N=1.6% and F-N=0.14% of the alcalase treating solution was obtained.

3) 200 ml of alcalase treating solutions obtained by the above 2 and 30 ml of crude enzyme liquid obtained by the above 1 are added to crude enzyme liquid and the hydrolysis 500ml Erlenmeyer flask by the protease M, and it was made to react at 37 ** for 24 hours, agitating with a magnetic stirrer. After ending reaction, chloride was added, pH was prepared to 5.0, and the enzyme was removed by filtering by Asahi Chemical Co., Ltd. make ultrafiltration module AIP-0013. 5g of protease M of Amano Pharmaceuticals is added in this liquid, and it was made to react at 50 ** for 30 hours, agitating with a stirrer (sample D). What was completely processed in a similar manner on the other hand except adding distilled water instead of crude enzyme liquid was made into the control sample (sample E). With the sample D, it was high with 40% to the cracking severity of the sample E having been 26% as a result of performing measurement of the sample D, E per T-N, and F-N (Table 2).

0024**Table 2**

0025Amino acid analysis was conducted about the samples D and E. In measuring whole amino acid, after hydrolyzing a sample at 120 ** under the chloride existence of 6N for 18 hours, when a free amino acid was measured, the JEOL Co., Ltd. make JLC-300 amino-acid-analysis device analyzed as it is. Although the result was shown in Table 7, it was checked that the liberation rate of the hydrophobic amino acid in which the liberation rate of taste amino acid, such as aspartic acid, threonine, glutamic acid, proline, and a glycine, is increasing substantially, and presents bitterness compared with the sample E is seldom increasing the sample D.

0026

Table 3

0027

Effect of the InventionA hydrolysis rate improves by combining processing by the

enzyme agent which contains prolyl proteinase, prolidase, and a prolinase in proteinic hydrolysis, and processing by exopeptidase. Since the liberation rate of the amino acid which was furthermore excellent in taste improves, it can use to hydrolysis of the protein of foodstuffs, especially a seasoning use effectively.
